

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-153713

(43)Date of publication of application : 29.11.1980

(51)Int.Cl.

A61K 9/14

(21)Application number : 54-054283 (71)Applicant : KUREHA CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 02.05.1979 (72)Inventor : WATANABE TAKATOSHI

(54) PHARMACEUTICAL PREPARATION OF RIBOSOME CONTAINING ACTIVE SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: The title ribosome pharmaceutical preparation having a high strength of wall membrane and improved prolonged release of an active substance, containing an active substance in its vacuole, obtained by forming the wall membrane wherein a specific amount of oily substance molecules exist in the bimolecular layer of phospholipid.

CONSTITUTION: A wall membrane, wherein 3W20wt%, preferably 5W15wt% of oily substance molecules exist in the bimolecular layer of phospholipid, e.g., Lecithin, is formed and contains an active substance in its vacuole. The oily substance is one compound selected from the group consisting of mineral oil, wax, triglyceride, or their mixture. The ribosome has a complex emulsion form of water in oil in water type (W/O/O type), and more improved retention ability of the active substance than conventional phospholipid micell type emulsion. The ribosome is suitable as a protective for a drug unstable in the living body or one having side effect and useful as a medicine.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭55-153713

⑫ Int. Cl.⁸
A 61 K 9/14

識別記号

府内整理番号
7057-4C

⑬ 公開 昭和55年(1980)11月29日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全19頁)

⑭ 活性物質含有リボゾーム製剤

⑮ 特 預 昭54-54283

⑯ 出 願 昭54(1979)5月2日

⑰ 発明者 渡辺孝寿

坂戸市鶴舞2-5-7

⑱ 出願人 吳羽化学工業株式会社
東京都中央区日本橋堀留町1丁
目8番地

⑲ 代理人 弁理士 宮田広豊 外1名

明細書

1. 発明の名称

活性物質含有リボゾーム製剤

2. 特許請求の範囲

- (1) リン脂質の2分子層内に油性分子が混在または結合してなる膜材をリボゾームの壁膜とすることを特徴とする活性物質含有リボゾーム製剤。
- (2) リン脂質がレシチンである特許請求範囲第1項記載のリボゾーム製剤。
- (3) 膜材が粗レシチン単独、あるいはこれと油性分子との混合物からなる脂質とする特許請求範囲第1項記載のリボゾーム製剤。
- (4) 油性分子が植物油、ロウまたはトリグリセリド単独、もしくはこれらの混合物である特許請求範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載のリボゾーム製剤。
- (5) トリグリセリドが植物油である特許請求

範囲第4項記載のリボゾーム製剤。

⑳ 膜材中の油性分子含有量が3~30質量%である特許請求範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載のリボゾーム製剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は活性物質を含有するリボゾーム製剤に関する。更に詳しくは、カプセル膜材として、粗レシチンの如き、一般式X-Y(式中、Xは極性親水性基を、Yは非極性疏水性基を示す)で表わされる①リン脂質と②ステアリン酸及び③トリグリセリドで代表される如き油性物質を含有する物質を単独で用い、あるいは一般式X-Yで表わされる化合物と前記の油性物質との混合物を用いて均される2分子層内に、一般式X-Yで表わされる物質以外の活性物質を複数又は結合せしめて成る、いわゆる複合エマルジョン的な複合を有するリボゾームの内腔に活性物質を含有せしめたリボゾーム製剤に関する。

従来、薬物を生体内に直接投与した場合には
(1)薬物に対する抗体形成と云う免疫学的問題、
(2)薬物が微的以外の組織にまでも取り込まれて生
ずる副作用拡大の問題、あるいは逆に、(3)薬剤が
微的組織を通過し難いために生ずる問題、更に
(4)薬剤が体内酵素による分解その他の活性を維持
し難い両面の生ずる場合が多い。これらの問題の
多くは、薬物を保護しつつ既存の組織に直接に運び
扱う抗体があれば、これを利用して薬剤の通過途
中の分解を抑えることなどによつて解決可能とな
る。

特開昭49-118826号は、上記問題を解
決し得る抗体として、一般式X-Y(式中、Xは
極性親水性基を、Yは非極性親水性基を示す)で
表わされる化合物、例えばレシチン、ホスファチ
ジルエタノールアミン、ホスファジルセリンな
どの純粋なリン脂質を用いて作つた少くとも1層
の2分子層を有する崩壊ラメラ(ミセル)構造を

- 3 -

以上では、流出速度の差しい上昇が起る。

これらの欠点のうち、膜の強度を改良するため
には、コレステロールなどのステロール系脂質を
膜中に混在せしめることが検討されている。しかし、
この方法で膜に抵抗性を与えることによつて
膜の強度は幾分増大するが、抵抗性は未だ充分に
は改良されていない。従つて、膜の強度と、抵抗
性とを共に満足せしめるリポソームはまだ開発さ
れていないのである。

本発明者は上記問題を解決し得る新規なリポソ
ーム用媒材を提供すべく研究した結果、純レシチ
ンを媒材とするリポソームが従来の純粋なリン脂
質を媒材としたリポソームに比べて、特異な運動
を示すこと、即ち柔軟性に富むと同時に内胞中の
物質の、特に生体内(*in vivo*)における柔軟性に
優れることを見出した。更に詳述すると、本発明
者は、上記純レシチンからなるリポソームと、従
来の純粋なリン脂質、例えばレシチンからなるリ

- 5 -

特開昭55-153713(2)
持つ小鼠、即ちリポソーム(前記の第1回参照)
の提供を示してゐる。このリポソームの内胞水
溶液中に活性物質を取り込ませて成る剤剤は、通常
または有効な周囲の条件下、例えば内臓内に於て
も、脂質が内胞内の活性物質を保護しているので、
墨口投与が可能である。またこの剤剤はその粒径
に応じて組織に対する透過性が変化するゆえに、
適切な粒径に調節することによつて透過性を高め
ることが可能である。従つて選択的に特定の組織
へ活性物質を送ることを可能にするものとして注
め注目されている。

しかしながら、この新規なリポソームは第1回
からも明らかなどとく、純粋な一般式X-Yで表
わされる物質、特にリン脂質からなつていて膜の
柔軟性に欠けていると共に、膜の強度も劣つてお
り、かつ内胞に含まれている活性物質の外部への
流出速度が過大であつて、柔軟性の点では必ずし
も満足ではない。特に脂質のグルーゾル酸基選択性

- 4 -

リポソームとを詳細に比較考察する内に、純レシチ
ンからなるリポソームの前記の特異運動は、2分子
層内に油性分子が混在または結合していること
に起因するとの結論に達し、本発明を完成した。

即ち、本発明は活性物質を取り込ませたリポソ
ーム剤剤として、一般式X-Yで表わされるリン
脂質に加えて、トリグリセリドのごとき油性分子
を共存せしめて成る脂質を壁膜とするリポソーム
の内胞に活性物質を含蓄せしめて成る、生体内に
於ける柔軟性に優れたW/O/W複合エマルジョン
型の新規なリポソーム剤剤を提供することを目的
とする。

本発明の特徴は、壁膜としてリン脂質のミセル
層内に油性物質分子が混在または結合している脂
質を用いることにあるが、この油性物質分子の存
在が製造工程に於てはカプセル收率の向上および、
従来の超音波処理によるリポソーム形成後の分離
操作の向上に伴う分離操作の容易化を來し、製

- 6 -

- 6 -

則としては臍位の均一性、置子の集散性、膜透過の向上、良好な均分散性を与えると共に生体内における致効性の著しい改善をもたらすことは極めて強くべきことである。

これらの効果の理論的解明は未だ完成されていないが、従来の純粹リン脂質とセル型リポソームとは異り、本発明のリポソームにあつては、リン脂質からなる2分子層内にある親水性基と油性分子とが相互に作用して、あたかもW/O/W複合ニマルジション型の形態をとり、複合エマルジョンとしての性質と、従来のリポソームの安定性とを兼備した結果であると考えられる。

以下本発明を詳述する：

本発明に係るリン脂質は通常リポソームの壁材として用いられる物質であれば特に限定されるものではなくて、一般式X-Yで表わされる化合物、例えばレシチン、フォスファチジルセタノールアミン、リゾレシチン、リゾフォスファチジルエ

- 7 -

ラムクロマトグラフィ（生化学実験用座席3番、脂質の化学：288～259頁、東京化学開発出版）で分別する酸、クロロホルムまたはクロロホルム・メタノール（100:1～50:1）で洗出する部分であつて純粹のレシチンに8～9割程度の油性物質、例えばトリグリセリドおよびカルテノイドなどが混入した混合物である。この油性物質は、脂膜中に3～35重量%、好ましくは5～25重量%存在するよう適宜含有量の選択ができる。

この含有量が上記上限を越すと、膜形成能が損われて、カプセル状の低下を來し、油性物質との効果が期待できなくなるので留意すべきである。なお、本発明の壁材に前記のステロール類およびリポソーム表面の荷電状態を変化せしめる物質、例えば魚の鰓荷付とのためのホスファチド類、リン酸ジセチルまたは牛脂のガングリオンド成いは正の鰓荷付とのためのステアリルアミンなどを認

- 8 -

特開昭55-153713(3)
タノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミリエリン、カルシオタピンなどの单体または、それらの混合物であるが、必要に応じニレステニール、エカルゴステロールなどのステロールを共存させてもよい。

また本発明に係る油性物質はトリグリセリドおよびロウなどの单体または、それらの混合物からなるもので、例えば大豆油、菜油油、ゴマ油などの植物油および石炭系成いは石油系由來の植物油が用いられる。

本発明の壁膜は、前記リン脂質と油性物質との混合物を壁材として、常用のリポソーム製法で作ることができ。この壁、脂質として粗レシチン単体または油性物質との混合物を用いると一層よい効果が発揮される。

ここで云う「粗レシチン」とは粗質、大豆油などから出来するリン脂質に富む成分をアルミナ

- 8 -

三成分として混在せしめてよい。この第三成分の添加量は使用するリン脂質の性質に応じて適当に定めればよく、通常壁材の0～10重量%である。

リポソーム製造用賦着の使用量は、リポソーム懸濁液1ml当たり1～50.0mgである。

本発明に於けるリポソーム製剤の製造には公知の技術が用いられるが、W/O/W複合型エマルジョン形態を形成させるために通常脂として水系溶液を使用する。例えば本発明の壁材を専用フィルムとして、このフィルムを活性物質を含有する達成相と接触させて複合分散せしめた後、この分散系に超音波振動を与える方法、或いは水に溶けない脂質に本発明の壁材を溶解させた溶液と、活性物質を含有する水系溶液とを混合後、超音波処理してリポソーム的壁材を形成せしめ、次いで壁材を含む溶液を水系緩衝液の共存下に油滴化処理を行なう方法、更にガラスビーズなどの表面に

- 10 -

して広く利用することができる。

上記の方法で得られる本発明のリポゾーム製剤は、平均粒径 0.1 ~ 1.0 ミクロン程度の粒子群分布の狭い粒子からなつており特に平均粒径 0.5 ~ 5 ミクロン程度の比較的大型のリポゾーム粒子で粒子群の均一なものが容易に得られる。この粒子は柔軟性に富み、かつ 2000 ~ 4000 r.p.m.程度の低速遠心分離装置が可能であり、更に脱離後の再分散は、特に超音波処理によらせ、極く容易するだけで行われて、もとの分散状態に復帰するなどの優れた性質を有する。

なお、本発明のリポゾーム製剤は、これの製造時に水系逆締型表面に油性物質の浮上が脱離されない事実から、リン脂質の 2 分子層内に油性物質が混在又は結合して成る壁膜を形成していると信ぜられる。

以上の説明で明らかなるとく、本発明に係るリポゾームでは従来のリン脂質セル型リポゾームと

-12-

比較すると、薬物保持能が格段に改善されているので、特に元来生体内で不安定な活性物質の保険剤として使用可能であり、また投与時の不可避な過剰高濃度によつて生ずる副作用を緩和性を利用して避けることができるなど優れた効果を發揮し得るものである。

本製剤の効率としての利用に就いては、経口、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、直腸内、局所などの経路による投与が可能であるが、特に皮下、筋肉内成いは局所投与が好ましい。投与量は投与方式、保険、活性物質の種類ならびに治療の程度に左右されるが、大略は、通常 1 日当たり活性物質投与量の 1 ~ 0.1 倍であつて、かつ投与間隔の延長が可能である。

例えは、インシユリンでは、従来日量 0.1 ~ 4 mg を 3 回に分け、毎日筋肉注射していた成人に対し、本発明による製剤 0.2 ~ 2.0 mg を 3 ~ 7 日に 1 回筋肉注射して同一効果を得た。

剤型としては、生理的食塩水に本製剤を懸濁せしめたものが注射薬として使用できる。

本発明のリポゾーム製剤を形成する脂材のみの急性毒性を以下に示す実験例の各試験についてラットを用いて皮下注射および静脈注射で測定した所、何れも 1000 mg/kg では、何らの毒性徵候も認められず安全と考えられる。

以下実験例を以つて更に詳しく説明する：

(以下省略)

実験例 1

市販粗粒レシチン(メルク社製)100mg、コレステロール11.6mgおよびステアリルアミン2.7mgを10mlのクロロホルムに溶解し、この溶液を内容25mlの丸底フラスコに入れ、このフラスコを四塗壁器皿に設置して、減圧下85℃でクロロホルムを留去することによってフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。このフラスコにアデノシン-3', 5'-サイクリックモノヌクレオチド(以下C-AMPと略称する)の1重量%水溶液を1ml加え、フラスコを80分振盪してフィルムをフラスコ内壁から剥離。分散せしめた後、生成した分散液を超音波処理機(日本精機製、NS200-2型)で20分間超音波処理して平均粒径1~2ミクロンの粒子の懸滴分散液を得た。次いでこの懸滴分散液の6倍量の食塩水をこれに加え、3000r.p.m. 10分間の遠心分離操作を3回行つて、リボゾーム製剤とリボゾーム内に取り込まれなかつ

たC-AMP(粗液)とを完全に分離した。かくて得られたリボゾーム製剤を1-1とする。比較のために、第1表に示す組成の試験料を用い、上記と同様な方法でリボゾーム製剤4種、即ち1-2, 1-3, 1-4および1-5を得た。

これらのリボゾーム製剤の摂取率およびC-AMPの膜外放出量の調定値を第1表に示す。第1表に見るとく、本発明による試験料、粗レシチンを使用することにより従来の試験料を使用したものよりも、摂取率および保持率が格段に改良された。

第 1 表

試験料	試験料組成 (mg)	摂取率 (%)	C-AMPの リボゾーム内保持率 (%)	
			リボゾームレシチン	コレステロール
本発明	1-1 リボゾームレシチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	28	99.2	
		1.0	89.0	
比較例	1-2 リボゾームレシチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	3.4	88.8	
	1-3 リボゾームレシチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	0.6	84.2	
	1-4 リボゾームレシチン 100 コレステロール 11.6	1.6	84.3	
	1-5 リボゾームレシチン 100			

-15-

註

(1) ここで用いた市販粗粒レシチン(メルク社製)および市販精製レシチン(シダーレ社製)の組成は下記の通り:

試験料	リボゾーム(粗液)	コレステロール(粗液)	油性物質
粗粒レシチン	93.8	1.1	5.1
精製レシチン	>99.0	0.3	0.2

*摂取率: 使用したC-AMPに対する、リボゾームに摂取されたC-AMPの重量率。

**保持率: 37℃で24時間保つた後のC-AMPのリボゾーム内の残留率。

実験例 2

実験例1におけるC-AMP水溶液の代りに20重量%のグルコース水溶液1mlを用い、その他の実験例1と全く同様な方法を用いて下記第2表に示す組成の各種試験料によるリボゾーム製剤(2-

1~2~12)を製造した。試験料に添加した粗実液の量と各リボゾーム製剤のグルコース摂取率の関係を第2図に示す。また、試験2-7, 2-8および2-9について37℃で行つた透過性試験の結果を第3図に示す。これらの図から本発明の有効性が明らかに認められる。

第 2 表

区分	試験料	試験料の組成	
		試験料 (mg)	粗実液に対する粗実液添加量 (重量%)
本発明	2-1 市販粗粒レシチン, 100		0
	2	〃	5
	3	〃	10
	4	〃	15
	5	〃	20
比較例	6	〃	40
	7 市販精製レシチン, 100		0
本発明	8	〃	5
	9	〃	10
	10	〃	15
	11	〃	20
比較例	12	〃	40

-69-

-17-

-18-

実施例3

下記第3図に示す組成の成形材を用い、実施例1と同様の方法でフラスコ内壁にフィルムを形成せしめ、これらの各々にインシュリンのクエン酸緩衝液(pH 2.5)による溶液(濃度 100mg/10ml)1mlを添加した後、実施例1と同様の方法で1~2ミクロロン程度の粒度のリボゾーム粒子懸濁分散液とした。これを空気中に24時間放置した後、6mgの生理的食塩水で1回、生理性食塩水でクエン酸緩衝液を混合した液(容積比 6:1)で2回処理し、遠心分離してリボゾーム製剤を得た。この製剤に更にクエン酸緩衝液を加えて、インシュリン濃度を40IU/ml(IUは国際単位)に調整した後、下記の実験を供した。

実験：生体内にシケルインシュリンリボゾーム持続性試験

ストレプトゾシンによる人工糖尿病模型SD最初ラットに上記で製造したそれぞれのインシ

封筒55-153713(6)
ニンリボゾームを皮下注射し、前後の血糖値の推移を測定した。第4回は、その結果を示すもので、縦軸は注射剤の血中グルコース濃度に対する注射後の血中グルコース濃度の比値を示し、横軸は注射後の経過日数を示す。なお、对照としてインシュリン注射剤との結果をも併せて示した。第4回に見るごとく、従来のリボゾーム製剤として用いたリボゾーム製剤はインシュリン持続性について(血糖低下時間の長いこと)遙かに優れている。

第3表

区分	試料	持続性試験			
		市販組合レンチン 100mg	コレステロール 11.6mg	ビアリバラン 2.7mg	対照 0mg
本発明	3-1	同上	同上	同上	~ 6mg
	3-2	同上	同上	同上	~ 12mg
	3-3	市販組合レンチン 100mg	同上	同上	~ 0mg

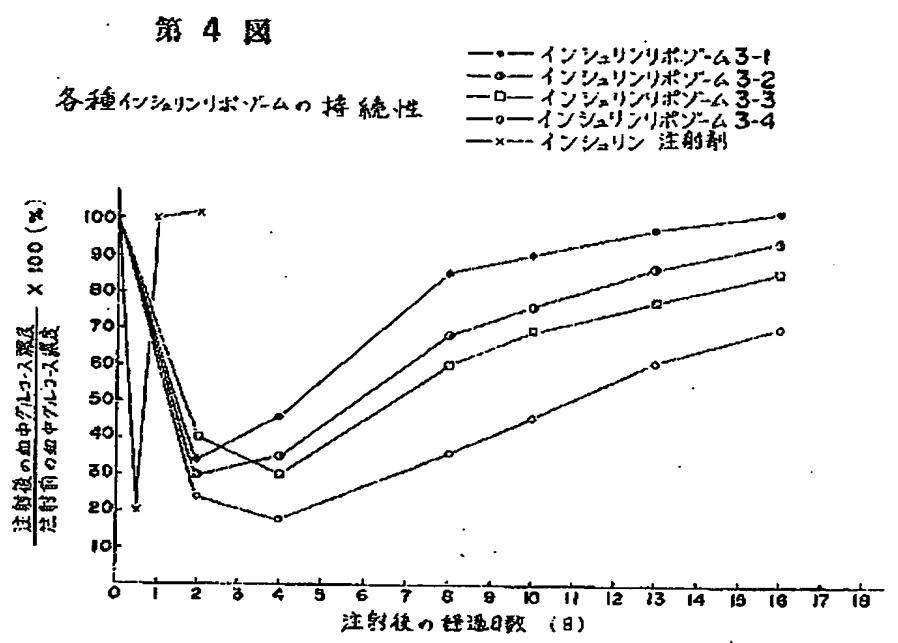
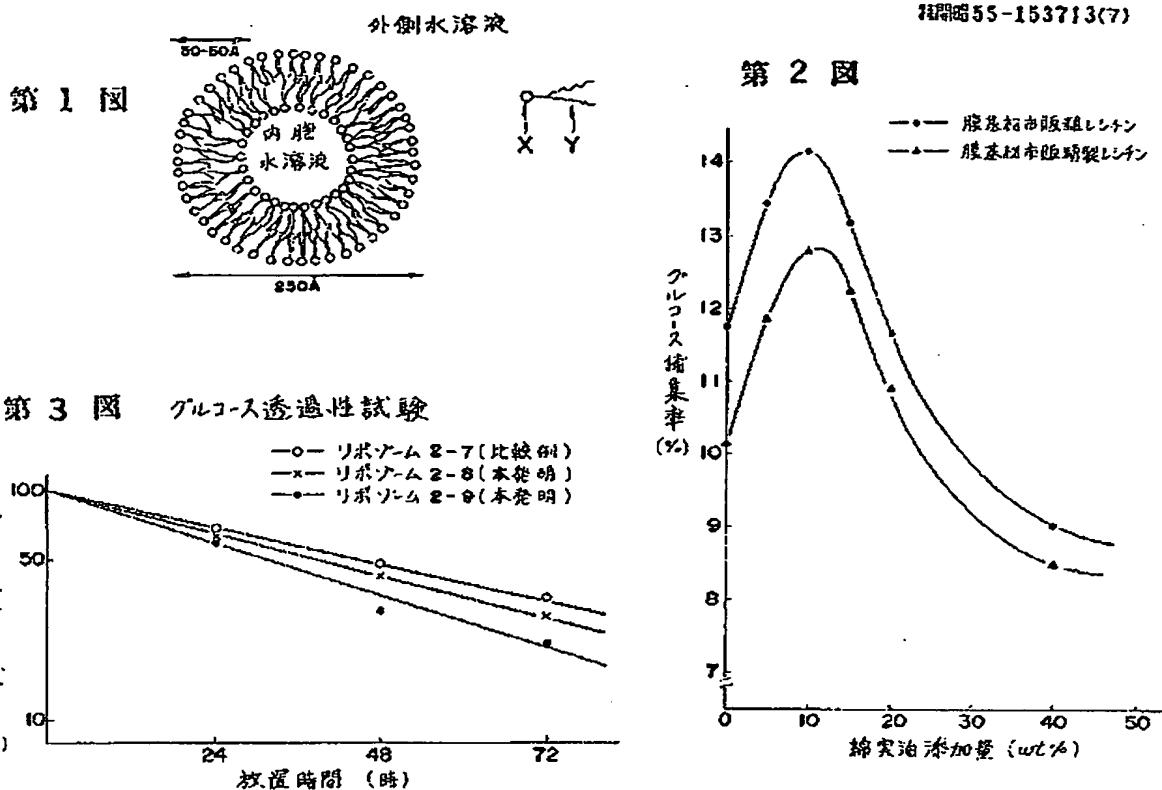
- 10 -

- 29 -

4. 図面の簡単な説明

第1図は合成リボゾームの模式図を示し、第2図は成形材成形中、離炎油添加量がグルコース摺取量におよぼす影響を、第3図は内包されたグルコースの遮蔽性試験結果を、および第4図は各種インシュリンリボゾームの持続性試験結果をそれぞれグラフ図表で示したものである。

由原人(00) 久利化成工業株式会社
代表人 宮田 広義
九田川 口義雄



手 続 换 正 書 (方式)

特開昭55-153713(8)

昭和 54 年 8 月 21 日

特許庁長官 川 原 能 雄 殿



1. 事件の表示 昭和 54 年 特願第 54288 号

2. 発明の名称 活性物質含有リポソーム製剤

3. 補正をする者
事件との関係
特許出願人

名称 (110) 長谷川化学工業株式会社

4. 代理人 〒100-1401 東京都千代田区麹町1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 100) 電話 (03) 354-8623

(7027) 代表士官 国 広
(ほか1名)

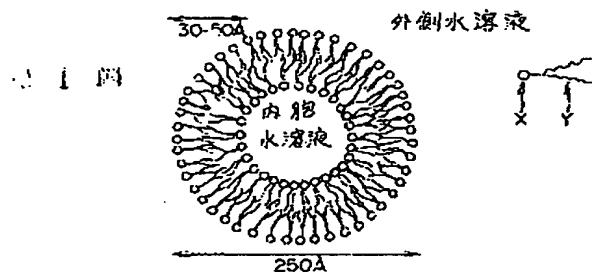
5. 補正命令の日付 昭和 54 年 7 月 7 日

6. 補正により増加する発明の数

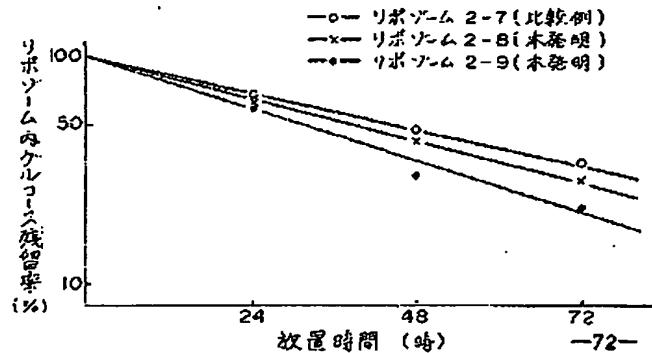
54.8.23
特許庁
第 2 図

7. 補正の対象 図 2

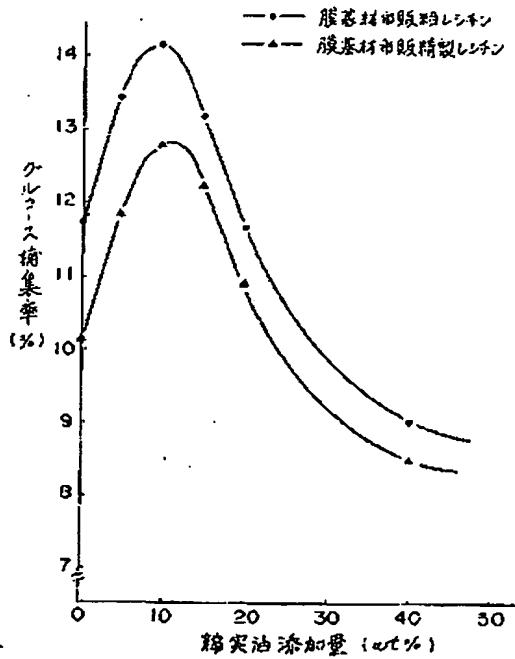
8. 補正の内容 図面を別紙の通り補正する。



第 3 図

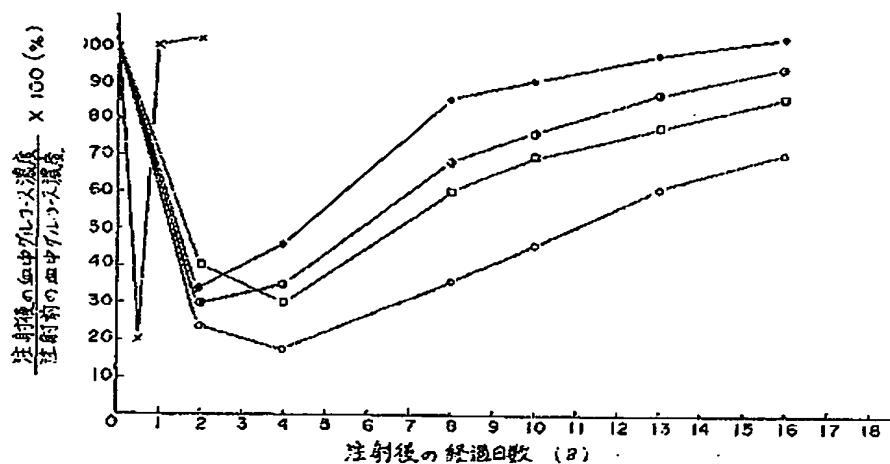


第 2 図



第4図

—●— インシュラーリボーム 3-1
—○— インシュラーリボーム 3-2
—□— インシュラーリボーム 3-3
—△— インシュラーリボーム 3-4
—×— インシュリン 注射剤



手 続 楠 正 告

昭和 55 年 6 月 24 日

特許庁長官 川原 良輔 殿

1. 事件の表示 昭和 54 年 特願第 54283 号

2. 発明の名称 后生元含有リボーム製剤

3. 楠正をする者 特許出願人
事件との関係

名称 (110) 貝羽化学工業株式会社

4. 代理 人 京都府城陽市新田 1 丁目 1 号 16 号 山田ビル
(郵便番号 610) 電話 (077) 256-8683(702) 会社名: 貝羽化学工業
(登記番号: 110)

5. 楠正命令の日付 昭和 55 年 5 月 25 日

6. 楠正により増加する発明の数

7. 楠正の対象 断面中、発明の名称の欄、明細書全文
及び図面

8. 楠正の内容

- (1) 明細中の発明の名称の欄に「活性物質含有リボーム製剤」とあるのを、「活性物質含有リボーム」と楠正する。
- (2) 明細書全文を別紙の通り楠正する。
- (3) 図面第 5 図を別紙の通り楠正する。
- (4) 図面中第 1 図を別紙朱名の通り楠正する。

明　　細　　書

1. 発明の名称

活性物質含有リボゾーム

2. 特許請求の範囲

(1) リン脂質の2分子層内に該リン脂質に対し
て3乃至20質量%の油性物質の分子が存在
している構造を有する壁膜から形成されてい
るリボゾームであつて、その内胞に活性物質
を含有して成る活性物質含有リボゾーム。

(2) 上記リン脂質がレシチンである特許請求の
範囲第(1)項に記載のリボゾーム。

(3) 上記油性物質が植物油、コウモリ油及びトライ
セライドから成る部から提取される油性物質
の1種であるか又は2種以上の混合物である
特許請求の範囲第(1)項記載のリボゾーム。

(4) 上記壁膜が少くとも1種の油性物質を少く
とも3重結合含有する植レシチンから成る特
許請求の範囲第(1)項記載のリボゾーム。

- 1 -

化合物、例えばレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどの純粋なリン脂質を試験として用いて形成した、少くとも1層の2分子層を有する明鏡テメラ(ミセル)構造を有する小胞、すなわち、リボゾームの内胞水溶液中に生理活性物質を含有して成るリボゾームを提案している。この活性物質含有リボゾームは、過酸化条件下、例えば、骨髄内においてもリボゾームを形成している壁膜がその内胞水溶液中の活性物質を保護しているので、該リボゾームを経口投与した場合でも上記活性物質の活性が損われることがない。また、このリボゾームはその粒径に応じて生体内的壁膜に対する透過性が変化するので、この粒径の大きさを調整することにより上記壁膜に対する活性物質の透過性を高めることができとなる。したがつて、上記リボゾームはそれが含有する生理活性物質を特定の生体組織へ選択的に供給することを可能にするものとして極めて注

- 8 -

3. 説明の詳細を説明

本発明は活性物質、特に生理性活性物質を含有するリボゾームに関する。

従来、薬物のごとき生理性活性物質を生体内に直接投与した場合には(1)薬物に対する抗体増殖と云う免疫学的問題、(2)薬物が膜的以外の組織にまで取り込まれて生ずる副作用拡大の問題、あるいは逆に、(3)薬剤が膜的組織を通過し難いために生ずる問題、更に(4)薬剤が体内酵素による分解その他の活性を維持し難い問題の生ずる場合が多い。

而して、上記したごとき問題は、薬物のよう生理性活性物質を、それを保護しつつ生体内的膜的組織に直接に運び得る細胞に担持して投与すれば解決されることになる。

上述した見地から、近年、特開昭49-118826号は、一般式X-Y(式中、Xは活性親水性基を、Yは活性性疏水性基を示す)で表わされる

- 2 -

目される。

しかしながら、上記提案されたリボゾームを形成している。上記したごとき純粋なリン脂質から成つている壁膜は柔軟性に欠けていると共に、その機械的強度も不完全であるという欠点がある。また、このリボゾームにおいてはその内胞に含まれる生理活性物質の外部への漏出速度が過大であるため、生理活性物質を生体内で長時間に放出する性質、いわゆる上記活性物質の持続性の点で必ずしも満足的でない。特に、上記リボゾームはそれを形成している壁膜のグルーゾル透移速度以上の透析条件下では上記活性物質の漏出速度が著しく上昇する欠点を有する。

上記リボゾームにみられる上記の欠点のうち、リボゾームを形成している壁膜の強度を改善する目的でコレステロールのごときステアロール系脂質を、試験としての脂溶性リン脂質に混在させることが提案されている。しかし、この提案によるリ

- 74 -

- 4 -

リボゾームを形成する壁膜の強度は煩らか増大するが、上記活性物質の除放性は未だ不満足である。

本発明者は、活性物質含有リボゾームにおける上述した現況にかんがみ、壁膜の強度が高く、かつ生理活性物質の体内における除放性が良好なリボゾームを提供すべく検討した結果、粗レシチンのごとき、油性分子を含有するリン脂質を壁材として用いて形成したリボゾームの壁膜が、従来公知の純粹なリン脂質を壁材として用いて形成したリボゾームの壁膜に比して除放性に富むと同時に、その内膜に含まれる生理活性物質の生体内における除放性に優れていることを見出した。

すなわち、油性物質の分子が混在又は結合したリン脂質から形成されるリボゾームが上述したごとき特性を示すことは著実的であると言ひ得る。

本発明の目的は、活性物質含有リボゾームにおいて、その壁膜の強度が高く、かつ上記活性物質の生体内における除放性が良好な新規なリボゾーム

— 5 —

上述のごとくリン脂質に油性物質が混在又は結合したものから成る。ここで用いるリン脂質は、従来リボゾームの壁膜として用いられているものであれば特に限定されるものでなく、例えばレシチン、フォスファチジル-エタノールアミン、リゾレシチン、リゾフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、カルジョリビンなどの単独または、それらの混合物であつて、必要に応じコレステリール、ニルゴステロールなどのステロール類を含有していてもよい。

また、上記リン脂質に混在又は結合させる油性物質は、トリグリセリド又は植物油及びこれらの混合物であつて、例えば大豆油、地豆油、ゴマ油のごとき植物油および石炭系或いは石油系由来の私物油から選択される。

本発明においては、粗レシチンは单独またはこれに上記したごとき油性物質を混合して用いるの

を選択することである。特許昭55-153713(1)

本発明のその他の目的は以下の記載から明らかにならるであろう。

本発明の特徴は、ミセル状態から成る壁膜により形成される小胞内に活性物質を包含するリボゾームにおいて、油性物質の分子が存在するリン脂質から成るミセル壁膜を除りリボゾームの壁膜として用いることである。

また、本発明の上記壁膜を用いて形成した活性物質含有リボゾームの特徴は、ことに添付の図1図に示すごときW/O/W型の複合エマルジョン形態を有し、生体内において上記活性物質のリボゾーム外部への優れた除放性を示すことである。第1回において、Xは親水性基を、Yは疎水性基をそれぞれ示し、上は水性溶媒を含有する小胞を示し、下はリボゾームの外側における水性程度を示す。

本発明のリボゾームを形成するための壁膜は上

— 6 —

が特に好ましい。

ここで用いる“粗レシチン”という用語は、卵黄、大豆油のごとき物質から由来するリン脂質に富む成分をアルキナカラムクロマトグラフィで分別する際、クロロホルム又はクロロホルムとメタノールの混合液(100:1万乃至3:2の割合の混合液)で溶出する部分であつて、純粋のレシチンに97乃至80%乃至20%以上の油性物質、例えばトリグリセリドおよびカロチノイドが混在した混合物から成るものと意味する。この粗レシチンを壁材として用いてリボゾームを形成するに当つては、形成されるリボゾームの壁膜中に上記活性物質が8乃至20重量%、好ましくは5乃至15重量%存在するように粗レシチン中油性物質の含量を調査する。なお、上記壁膜中の油性物質の含量が20重量%を超えると被遮蔽の形成が抑われてリボゾームの収率が低下するので留意すべきである。一方、上記壁膜中の油性物質の含量が

3. 領量がより低くなると上述した本発明の目的が達成されなくなる。

また、本説明のリポゾームの形成に際して、上記成分にコレステロール、エカルゴステロールのどときステロール類およびリポゾーム表面の荷物状態を変化し得る物質、例えば負の電荷付与のためのホスファチド酸、リン酸ジセチルまたは牛脂のガングリオンド或いは正の電荷付与のためのステアリルアミンなどを第三成分として混在せしめてよい。この第三成分の添加量は既述するリン脂質の性質に応じて適当に定めればよく、通常脂質の0~10質量%である。

上記リン脂質と油性物質が混在する混合物を膜材として用いて本発明のリボソームを形成するには、従来法を適用し得る。例えば、上記膜材を脂層フィルムに形成し、このフィルムを活性物質を含有する連続相と接触させて攪拌分散させたのち、この分散系に透析装置を与える方法、又は水に

- 9 -

してリポゾーム吸収の向上、およびリポゾームの形成後のリポゾームの分離操作の容易性、リポゾームの粒径の均一性、リポゾームの空調の柔軟性と強度の向上、リポゾームの内腔に包含される活性物質の生体内における放出性の改善をもたらすものである。

本発明のリポゾームの形成に供して使用される活性物質、特に生理活性物質としては、インシニリン、オキシトシン、バゾプレシン、副腎皮質醇ホルモン（A C T H）、興味ホルモン放出ホルモン（S H - R H ）カルシトニン、スタチンのごときペプチドホルモン、興味ホルモン、副腎ホルモン、副腎皮質ホルモンのごときステロイドホルモンおよびプロスタグランジン、アデノシンーダ、ピーサイタリツクモノボヌフエートのごときその他のホルモン、或いはタロラムブナル、ストレプトゾトシン、メソトレキセート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、マイトマイシン

特開昭55-153713の2
 不溶性被膜に上記膜材を溶解した溶液と、上記活性物質を含有する水系被膜とを混合後、超音波処理してリボゾーム前駆体を形成せしめ、次いで前駆体を含む溶液を水系被膜の共存下に超遠心処理を行なう方法、更にガラスビーズなどの界面に上記膜材を被覆した後、この被覆したビーズを上記活性物質含有溶液と混合して該溶液中に分散させる方法を適用し得る。上記リボゾームの形成処理して用いる上記膜材の量はリボゾームが懸濁している液1ml当たり1～500μgである。

上述のごとくして得られる本発明のリポソームはそれを形成している膜材中のリン脂質が有する親水性基と膜材中に存在する脂質性質の分子とが相互に作用して形成したものであつて公知の純粹なリン脂質ミセル型のリポソームとはその構造が本質的に相違していると認め得る。

また、本発明のリボゾームの過剰を構成している複数物質は、底材からのリボゾームの形成を妨

— 10 —

C. プレオマイシン、多糖体系抗疎過剤などの抗疎過剤、ペニシリン、セフアロスボリン、ストレプトマイシンなどの抗生素質、アミノグルコシダーゼ、インペルターゼなどの酵素剤を例示することができる。

本発明のリバゾームは、平均粒径 0.01~1.0 μ のタロン樹脂の粒子径分布の狭い粒子からなつており特に平均粒径 0.5~5 μ タロン樹脂の比較的大型のリバゾーム粒子で粒子径の均一なものが容易に得られる。この粒子は柔軟性に富み、かつ 3000~4000 r.p.m. 程度の低速遠心による沈殿が可能であり、更に機械的の再分散は、特に超音波処理によらず短時間吸収するだけで行われて、もとの分散状態を復活するなどの優れた性質を有する。

本説明のリボゾームは、上述したごとき特性から理解されるよう、従来のリン脂質とセル型リボゾームと比較してその内膜に含有する蛋白質組成

の保持能力が著しく優れており、かつ、既述したことより上記活性物質の持続性も良好であるので、生体内で不安定な薬物、および不可逆的な還元性の投与により副作用を生ずる薬物の保護剤として特に好適である。したがつて、本発明のリボゾームは医薬として有効に利用し得る。

例えば、本発明のリボゾームをインシユリン注射液として適用すると従来日量0.1～4mgのインシユリンを3回に分け、毎日筋肉注射していた成人に対し、本発明による製剤0.2～2.0mgを2～7日に1回筋肉注射して同一効果を得ることができる。

本発明のリボゾームは医薬として利用する場合には、経口、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、直腸内、局所などの諸経路による投与が可能であり、特に皮下、筋肉内或いは局所投与が好ましい。投与量は投与方式、経路、活性物質の種類ならびに治療の程度に左右されるが、大略は、通常1日

- 13 -

均一に保持し得、したがつて、該物質の効果を十分に發揮することができ、かつ副作用も抑制し得る。

本発明のリボゾームを形成するための前記膜材の活性性を、以下に示す各実施例で用いた臍帶についてラットを用いて皮下注射および静脈注射を行つて測定した結果、何れも1000mg/kgまでは何らの毒性徵候も認められなかつた。したがつて、本発明のリボゾームは医薬として安全に適用し得る。

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。

実施例1

市販粗部質レシデン（メルク社製）100mg、コレステロール：1.6mgおよびステアリルアミン2.7mgを19型のクロロホルムに溶解し、この溶液を内容2.6mlの丸底フラスコに入れ、このフラスコを回転蒸発機に設置して、減圧下55℃でク

特開昭55-153713(13)
より活性物質投与量の0.1～1倍であつて、かつ投与間隔の延長が可能である。

なお、本発明のリボゾームは生理的食塩水に溶解させることにより注射薬剤として使用し得る。

特に、本発明のリボゾームにおいて活性物質としてペプチドホルモン類を含む各種ペプチド性生理活性物質を含有したリボゾームは皮下又は筋肉内注射剤として適用すると卓効を発揮する。一般に、ペプチド性生理活性物質は生体内での分解が速いのでその効果を維持するためには該物質の過剰投与（注射）が必要となり、したがつて、患者の負担が大きくなるのみでなく、上記物質の血中濃度に大きな変動がみられ、その結果該物質の投与効果が低下し、かつ副作用が発現し易くなる。

これに対し、本発明のリボゾームは後記実施例に示すとく、皮下又は筋肉内注射においても優れた持続性を示すので投与回数を大幅に減らし得ると共に、ペプチド性生理活性物質の血中濃度を

- 14 -

ココホルムを留去することによってフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。このフラスコにアデノシン-3'、5'-サイクリングリコノヌフエート（以下C-AMPと略称する）の1重量当水溶液を1ml加え、フラスコを30分振盪してフィルムをフラスコ内壁から剝離。分散せしめた後、生成した分散液を超音波細胞破砕（日本精機製、NS 200-2型）で20分間超音波細胞破砕して平均粒径1～2ミクロンの粒子の懸濁分散液を得た。次いでこの懸濁分散液の6倍容の生理的食塩水をこれに加え、3000r.p.m. 10分間の遠心分離操作を3回行つて、形成されたリボゾームとリボゾーム内に取り込まれなかつたC-AMP（粗液）とを完全に分離した。かくて得られたリボゾームを1-1とする。比較の為に、前1段に比較例として示す組成の調材料を用い、上記と同様の方法でリボゾーム4種、即ち1-2, 1-3, 1-4および1-5を得た。

- 15 -

- 16 -

これらのリボゾームのC-AMPの摂取率およびC-AMPの紫外吸収の測定値を第1表に示す。第1表に見ると、本発明による膜材、即レシチンを使用することにより従来の膜材を使用したものよりも、摂取率および保持率が著しく改良された。

第1表

試料	膜材組成(%)	摂取率(%)	C-AMPのリボゾーム内保持率(%)
本発明	市販純レシチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	28	89.2
比較例	市販純レシチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	1.0	89.0
	市販純レシチン 100 ステアリルアミン 2.7	3.4	88.9
	市販純レシチン 100 コレステロール 11.6	0.6	84.2
	市販純レシチン 100	1.6	84.3

注

(1) ここで用いた市販純レシチン(メルク社製)および市販精製レシチン(シグマ社製)の組成は下記の通り:

-17-

び2-9について37℃で行つたグルコースの透通性試験の結果を第3図に示す。これらの図から本発明のリボゾームの透通性が明らかに認められる。

第2表

区分	試料	膜材の組成	
		純 レシチン(%)	膜材に対する純油添加率(重量%)
本発明	2-1	市販純レシチン 100	0
"	2	"	5
"	3	"	10
"	4	"	15
"	5	"	20
比較例	6	"	40
"	7	市販純レシチン 100	0
本発明	8	"	5
"	9	"	10
"	10	"	15
"	11	"	20
比較例	12	"	40

特願昭55-153713(14)

※ 摂取率: 使用した C-AMP に対する、リボゾームに摂取された C-AMP の百分率。

※ 保持率: 37℃に 24 時間保つた後の C-AMP のリボゾーム内の保持率。

試 料	リン脂質(过量%)	コレステロール(过量%)	油性物質
純レシチン	93.8	1.1	5.1
精製レシチン	99.5	0.3	0.2

実施例2

実施例1におけるC-AMP水溶液の代りに20重量%のグルコース水溶液1mlを用い、その他の実施例1に記載と全く同様手順で下記第2表に示す組成の各種膜材からリボゾーム(2-1乃至2-12)を形成した。膜材の一成分である純油性物質の量と各リボゾームのグルコース透収率の関係を第2図に示す。また、試料2-7, 2-8および

-18-

実施例3

下記第3表に示す組成の膜材を用い、実施例1に記載と同様の手順でプラスニ内壁にフィルムを形成せしめ、これらの各々に、クエン酸緩衝液(pH 2.5)1.0mlとインシルリン1.0mlを含む溶液1mlを添加した後、実施例1に記載と同様の手順で1~2ミクロン程度の粒径のリボゾーム粒子懸濁分散液を調製した。これを常温に24時間放置した後、6mlの生理的食塩水で1回、生理的食塩水にクエン酸緩衝液を混合した液(容量比6:1)で2回処理し、遠心分離してリボゾームを得た。このようにして得られたリボゾームは更にクエン酸緩衝液を加えて、インシルリン濃度を40IU/ml(IUは国際単位)に調節した後、下記の実験に供した。

実験: 生体内におけるインシルリンリボゾーム

持続性試験

ストレプトゾシンによる人工糖尿病模型SD

三組ラットに上記で製造したそれぞれのインシニリンリポゾームを皮下注射し、このインシニリンリポゾームの投与前後の血清値の推移を測定した。第4図は、その結果を示すもので、縦軸は注射前の血中グルコース濃度に対する注射後の血中グルコース濃度の比値を示し、横軸は注射後の経過日数を示す。なお、対照としてインシニリン注射剤投与の結果をも併せて示した。第4図に見るとく、本来油性物質を含有している粗レシチンを用いて調製した本発明のリポゾームを適用したラット体内にインシニリンの持続性（低い血清値が長時間保たれること）は、油性物質を含有しない精製インシニリンを用いて調製した従来のリポゾームを適用した場合に比し確かに優れている。

（以下省略）

区分	試料	経時的経過			
		市販粗レシチン 100mg	コレステロール 1.6mg	ステアリルアミン 2.7mg	結晶油 0mg
本発明	3-2	同上	同上	同上	~ 6.4
	3-3	同上	同上	同上	~ 12.0
	3-4	市販粗レシチン 100mg	同上	同上	~ 0.4

実施例4

本例は本発明のリポゾームに内包された活性物質が生体内において如何なる挙動を示すかを示したものであつて、上記活性物質としてトリチウムで標識した黄体形成ホルモンを放出するホルモン（New England Nuclear 社製）を用いて下記の各試験を行つた。

なお、各試験に用いたリポゾームは次のような手順で調製した。

市販粗卵卵レシチン（メルダ社製）100mg、

-22-

コレステロール 1.6mg およびステアリルアミン 2.7mg を 1.0 ml のクロロホルムに溶解し、この溶液を内径 2.5 mm の丸底フラスコに入れ、このフラスコを回転蒸発機に設置して、減圧下 3.8°C でクロロホルムを留去することによってフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。

上記フラスコにトリチウムで標識した、黄体形成ホルモンの放出ホルモン（250 μCi / 7.3 mg, New England Nuclear 社製、以下放ホルモンを ³H-LH-RH と略称する）の 1 μg / ml 含有生理的食塩水溶液を 1 ml 加え、ついで上記フラスコを 8 分振盪してフィルムをフラスコ内壁から剥離・分散せしめた後、生成した分散液を超音波処理液（日本精機社製、NS200-2型）で 5 分間超音波処理して平均粒径 1 ~ 2 ミクロンの粒子の懸濁分散液を得た。次いでこの懸濁分散液の 3 倍容の生理的食塩水をこれに加え、3000 r. p. m. 10 分間の遠心分離操作を 2 回行つて、形成されたリポゾームとリポゾーム内に取り込まれなかつた ³H-LH-RH の溶液とを完全に分離した。リポゾームの ³H-LH-RH の回収率は 20 % by weight であつた。上述のようにして得られたリポゾームに生理的食塩水を加えて濃度 3.42 μCi / ml したものを試料として用いた。

実験 1

上記のようにして調製したリポゾーム試料とリポゾーム形態にしていない遊離形態の ³H-LH-RH を各々マウスに皮下注射し、血中ラジオアイソトープ（R.I.）量の経時的推移を調べた。使用マウスは ICR マウス雄、体重 3.0 ~ 3.2 g のもので 1 頭 3 匹とした。投与量は一匹当たり 0.34 μCi とした。血中 R.I. 量はマウス血清を 0.25 ml 沢山し、サンプルオキシダイヤー（パッカート社製）で処理後、液体シンテレーションカウンターで測定した。投与後 15 分の血中 R.I. 量を 100 として、各経過時間ごとの結果を第 5 図に示した。

第 9 図から見られるごとく、本発明により調整したリボゾームに内包されたホルモンは生体内で緩やかに放出される。

実験 2

上記リボゾーム試料と上記造影形態の³H-LH-RH をそれぞれラットに皮下注射し、尿および糞中の RI 排泄量の経時的推移を調べた。使用ラットは SD ラットで、体重 100~110g のものであつて、一匹 3 匹とした。上記リボゾーム試料ならびに³H-LH-RH の各投与量は一匹当り 0.66 μCi とした。R I の生体から排泄量は、尿の場合蒸留水で 100 倍に希釈後、又糞の場合は粉末状とした後、サンプルオキシダイヤーで処理し、液体シンチレーションカウンターで測定した。結果は上記投与量を 1.00 とした各時間毎の回収 R I 量を校正した形で第 9 図に示した。なお糞中には RI は検出されなかつた。

第 9 図から、本発明により調整したリボゾーム

-25-

得る。

4. 図面の説明

第 1 図は本発明のリボゾームの模式図を示したものであり、第 2 図は活性物質としてグルコースを内包した本発明のリボゾームにおいて該リボゾームを形成している膜材中の油性分子の位置と上記グルコースの摂取率との関係を示したものであり、第 3 図は活性物質としてグルコースを内包した本発明のリボゾームと比較例のリボゾームにおける上記グルコースのリボゾームに対する透過性の比較を示したものである。

第 4 図は活性物質としてインシュリンを内包した本発明のリボゾームの生体内におけるインシュリンの血糖降下作用の持続性を比較例と対比して示したものであり、第 5 図乃至第 8 図は本発明のリボゾームのそれが内包した活性物質の生体内における緩放性を示したものであつて、

-87-

特開昭55-15371305
に内包されたホルモンは生体内で緩やかに放出されることが認めし得る。

実験 3

上記リボゾーム試料と造影形態の³H-LH-RH をマウスに皮下注射し、その各投与部位における経時的残留 RI 量を追跡して測定した。使用動物は ICR マウス雄で、体重 30~32g のものを 1 群 2 匹とした。上記各試料の投与量は一匹当り 0.165 μCi とした。残留 RI 量は投与部位を取り出し、SOLUENE (パッカード社製) で溶解後、液体シンチレーションカウンターで測定した。試験結果は造影形態の³H-LH-RH を投与した場合は第 7 図に示すとおり R I の残留量は短時間で著しく減少するが、これに対しリボゾーム形態の試料を投与した場合は第 8 図に示すとおり R I の残留量は極めて緩慢に減少する。

上掲の実験 1~3 の結果から本発明のリボゾームに内包される活性物質の優れた緩放性が立証し

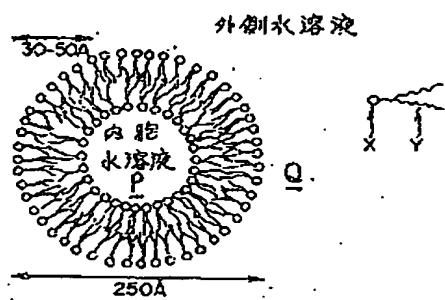
-26-

第 6 図は活性物質として臍物質をラジオアイソotope で標識したもの用いて形成したリボゾームを皮下注射したのちの血中のラジオアイソotope の量の経時的变化を示しており、第 6 図は上記のごとく標識した活性物質を内包したリボゾームを皮下注射したのちの血中のラジオアイソotope の量の経時的变化を示しており、第 7 図は比較例として上記標識した活性物質をそのまま皮下注射したのち投与部位におけるラジオアイソotope の残留量の経時的变化を示しており、および第 8 図は上記標識した活性物質を内包したリボゾームを皮下注射したのちの投与部位におけるラジオアイソotope の残留量の経時的变化を示したものである。

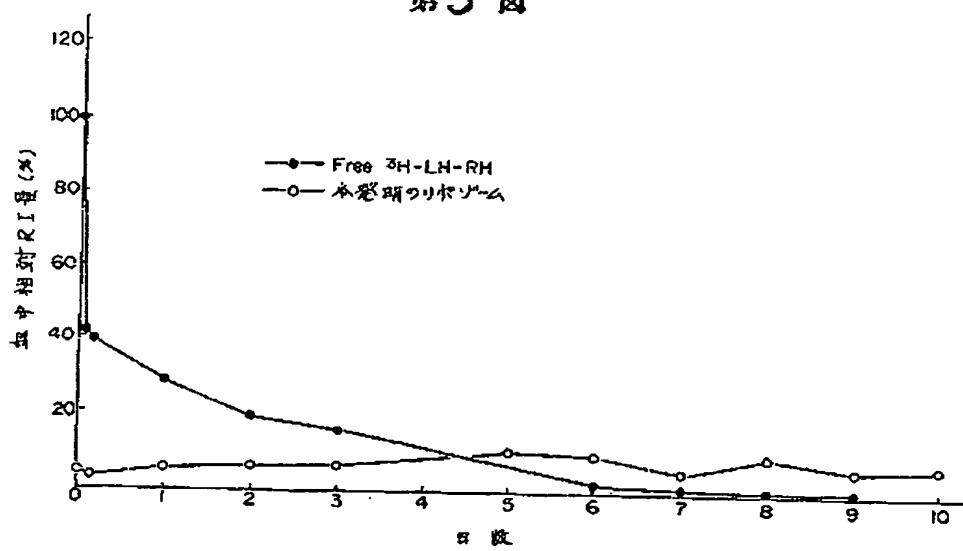
-80-

-28-

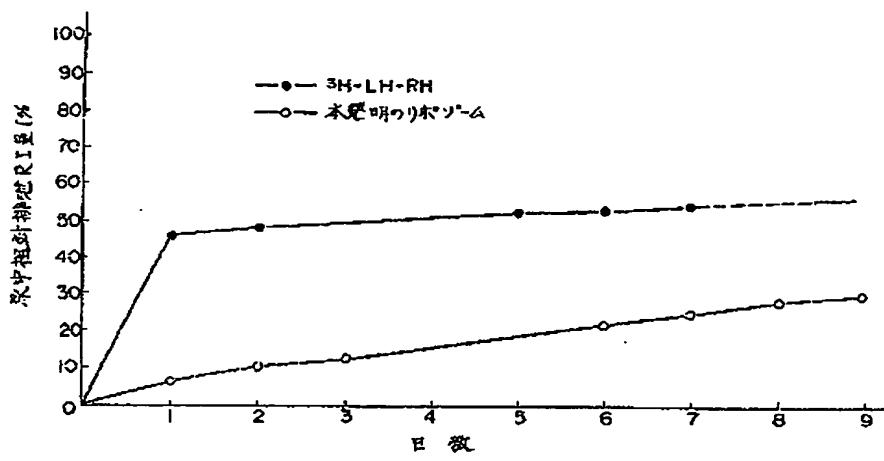
第1図



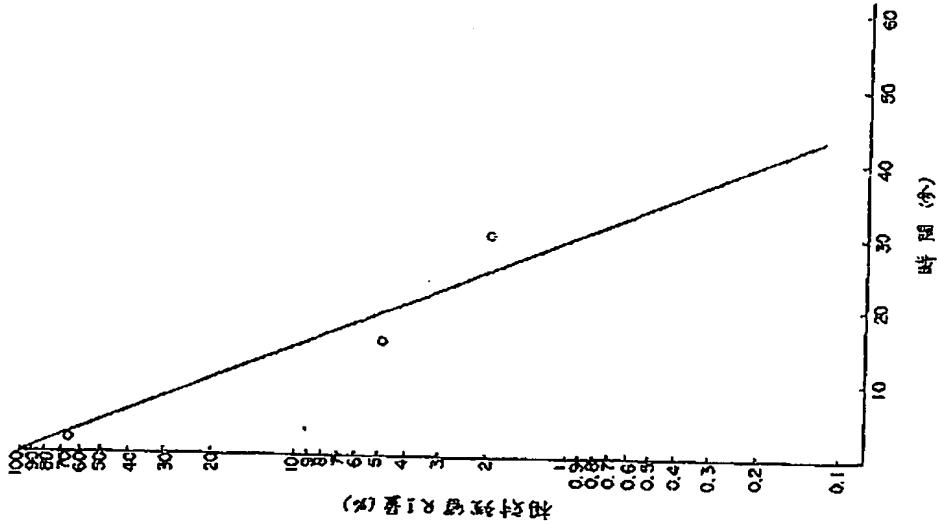
第5図



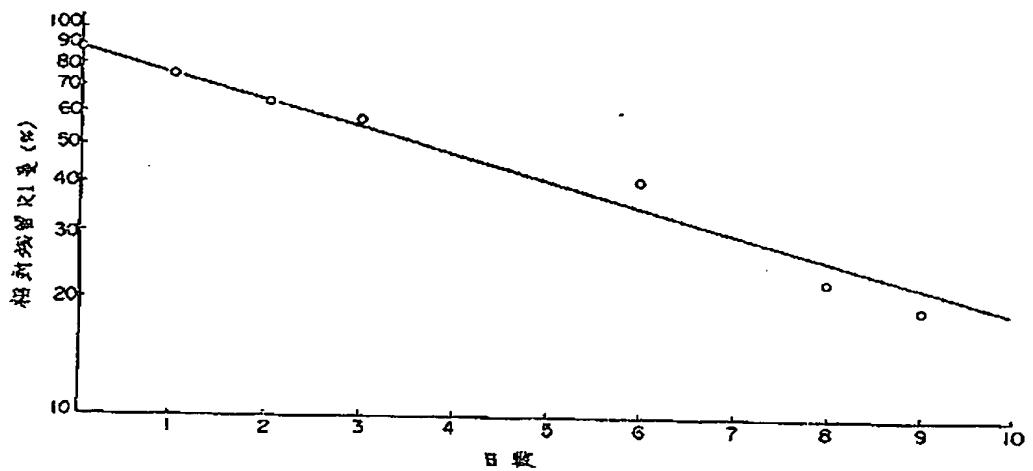
第6図



第7図



第8図



昭 61. 5. 19 67

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 54 年特許願第 54333 号(特開 昭 55-153713 号、昭和 55 年 11 月 29 日発行 公開特許公報 55-1538 号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があつたので下記のとおり掲載する。 3 (2)

Int. C.I. 4	識別記号	庁内整理番号
A61K 9/14		8742-40

手 約 補 正 類

昭和 61 年 2 月 1 日

特許庁長官 宇賀雄四郎

1. 事件の表示 昭和 54 年 特許願第 54333 号

2. 発明の名称 活性物質含有リボゾーム

3. 補正をする旨
事件との関係 特許出願人

名 员 (160) 四群化学工具株式会社

4. 代 表 人 東京都新宿区新宿 3 丁目 1 番 14 号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8823
(6208) 弁理士 加口 桂

5. 補正命令の日付 自 然

6. 補正により増加する発明の数

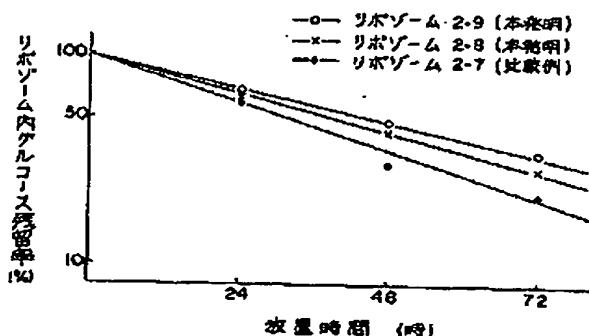
7. 補正の対象 図面

8. 補正の内容 本願図面中、第 3 図を別紙の通り補正する。

557
61. 2. 20
出願人
代理人

方 式
審査

第 3 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.